

## **A diabetes hatása a terhes patkány uterus működésére és farmakológiai reaktivitására**

### **Zárójelentés**

A gesztációs diabetes mellitus (GDM) egyike a leggyakoribb terhességi komplikációknak, megfelelő kezelése a szülészeti gyakorlat egyik legnagyobb kihívása. A GDM a terhességek kb. 7 %-ában fordul elő, ez felel a diabetesszel szövődött terhességek 90 %-áért. Annak ellenére, hogy a GDM az egyik leggyakoribb szülészeti komplikáció, kevés adat áll rendelkezésre az experimentális GDM uteruskontraktilitást, valamint farmakológiai reaktivitást befolyásoló hatásával kapcsolatban. Mivel a myometriális aktivitás szabályozásában az adrenerg rendszernek kulcsszerepe van, célul tűztük ki a kísérletes GDM myometriális idegfunkciókra kifejtett hatásainak feltárását. A myometriális noradrenerg transzmisszió preszinaptikus oldalának funkcionális vizsgálatát szuperfúziós technikával végeztük, diabeteses és kontroll állatokkal. A posztzinaptikus hatások elemzésére szelektív adrenerg agonisták jelenlétében vettünk fel dózis-hatás görbéket izolált szervi körülmények között. Hasonló módon vizsgáltuk az uterus GDM függő oxytocinnal szembeni érzékenységet a gesztáció III. trimeszterében. Az izolált szervi kísérletek alapján kiválasztott kondíciókban meghatároztuk az adott receptor expresszióját RT-PCR technikával.

### **Módszerek**

#### **Diabetes mellitus indukció streptozotocin (STZ) kezeléssel**

200-250 g nőstény Sprague-Dawley patkányokat használtunk. A terhes állatoknál az indukció a terhesség 5. napján történt, egyszeri 60 mg/kg STZ-vel i.v. A hiperglikémiát se-glükóz méréssel igazoltuk.

#### **Szuperfúziós vizsgálatok**

A szövetmintákat  $10^{-7}$  M [ $^3$ H]-noradrenalinval inkubáltuk 37 °C-on 60 percig. [ $^3$ H]-noradrenalin felvételt és felszabadulást határoztunk meg. A transzmitter felszabadítást

elektromos erőtér ingerléssel(EFS) idéztük elő (40 V feszültség, 2 ms jelszélesség, 2Hz frekvencia). A szuperfúzió paraméterei: áramlási sebesség 1 ml/perc, a szuperfúziós puffer MAO gátló pargilint, noradrenalin reuptake gátló dezipramint és dezoxikortikoszteront tartalmazott (10  $\mu$ M).

### Izolált szervi vizsgálatok

Az  $\alpha$ -adrenerg receptoron létrejövő kontrakciókat  $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M noradrenalin dózis-hatás görbékkel jellemeztük. A  $\beta$ -adrenerg receptorok által mediált relaxációt  $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M terbutalin dózis-hatás görbékkel vizsgáltuk. A kontrakciót 50 mM KCl-al hoztuk létre. A cervix rezisztencia vizsgálatokban az izolált cervixek mechanikai nyújtással szembeni relaxációs válaszát vizsgáltuk.

### RT-PCR vizsgálatok

Az  $\alpha_1$  és  $\beta_2$  adrenerg valamint oxitocin receptorok mRNS expresszióját vizsgáltuk szelektív primer-ek felhasználásával. Belső kontrollként patkány  $\beta$ -aktint használtunk.

## Eredmények

### - Szöveti aktivitás

A terhesség előrehaladtával az uterus [ $^3$ H]-noradrenalin felvevő kapacitása csökkent, mely az implantációs területeken kifejezettebb. Kísérletes GDM-ben minden gesztációs állapotban szignifikánsan csökkent a myometrium transzmitter felvevő kapacitása.

### - EFS [ $^3$ H]-noradrenalin felszabadulás

A nem terhes uterusban a DM szignifikáns csökkenést okozott az EFS hatására bekövetkező transzmitter felszabadulásra. A terhesség 7., 14. és 21. napján a [ $^3$ H]-noradrenalin felszabadulás alacsonyabb tendenciát mutatott a diabeteses állatokban mint kontrollban. A különbség azonban messze nem olyan markáns mint a nem terhes állatokban.

### - Agonista indukált kontrakció ill. relaxáció

Nem terhes állatokban a DM fokozta a noradrenalinra adott kontrakciós választ, ezzel párhuzamosan csökkentette a terbutalin relaxációs hatását. Terhességben nem találtunk

DM függő eltérést az adrenerg agonisták hatásaiban. A terhesség III. trimeszterében (15. és 21. nap) a DM állatok szignifikánsan érzékenyebbek az oxitocinra, mely a terminusban (22. nap) nem volt kimutatható.

Az utóbbi években számos tanulmány bizonyította, hogy a  $\beta_3$ -adrenerg receptorok alapvető szerepet játszanak a terhes uterus motoraktivitásának szabályozásában. A  $\beta_3$  altípusszelektív adrenerg receptor agonisták új potenciális tocolyticumok kifejlesztésére adhatnak lehetőséget. Mindezek alapján meghatároztuk a  $\beta_3$ -AR-ok mRNS expresszióját diabeteses és kontroll állatokon, valamint izolált szervi vizsgálatokkal megvizsgáltuk a  $\beta_3$ -AR altípusszelektív agonista BRL-37344 hatását a terhes uterus kontraktilitására GDM és kontroll állatokon. A  $\beta_3$ -AR mRNS expressziója szignifikánsan csökkent a diabeteses állatok uterusában különösen a terhesség 15. napján. A BRL-37344 relaxációs hatása szintén szignifikánsan csökkent diabetesben a kontrollhoz képest.

#### - RT-PCR vizsgálatok

Az  $\alpha_{1A}$ - és  $\beta_2$ -receptor esetében nincs DM függő eltérés a mRNS expressziójában. Az  $\alpha_{1B}$  altípus mRNS expressziója emelkedett, míg  $\alpha_{1D}$  altípus mRNS expressziója csökkent a diabeteses állatok mintáiban. A 15 napos diabeteses állatokban az oxitocin receptor mRNS expressziója szignifikánsan nagyobb a kontroll állatokhoz viszonyítva.

#### - A gesztációs diabetes hatása a cervix rezisztenciára

Korábbi vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a corpushoz képest a cervix ellentétesen reagál a tocolyticumokra. A  $\beta_2$ -AR agonisták, az  $\alpha_1$ - és  $\alpha_2$ -AR antagonisták valamint a Ca-csatorna blokkolók dózisfüggően gátolják a myometrium kontraktilitását, ugyanakkor fokozzák a cervix rezisztenciáját. A Ca-csatorna blokkolókkal kapcsolatos megfigyeléseinket még nem publikáltuk. Diabeteses terhes patkányokban azt találtuk, hogy a terhesség 21-22. napján azaz a terminusban a cervix rezisztenciája szignifikánsan nagyobb a kontroll állatokhoz viszonyítva. Ezt a fokozott rezisztenciát  $\beta_2$ -mimetikum (terbutalin) nem tudja tovább növelni. Feltételezésünk szerint diabetesben a cervikális glikolizált kollagén mennyisége jelentősen megnő, mely a rezisztencia fokozódását eredményezi.

### **Megbeszélés**

Terhesség alatt az uterus jelentősen átalakul, mely magában foglalja a myometriumot és a vasculáris rendszert ellátó idegrostok denervációját. Ez a terhesség indukálta denerváció minden típusú ideget érint, de általánosan elfogadott, hogy az adrenerg rostok visszafejlődése nagyobb fiziológiai jelentőséggel bír, mint a kolinerg és peptiderg idegeké. A denerváció oka máig tisztázatlan, de kézenfekvő, hogy az uterus idegeinek elvesztése jelentősen hozzájárul a főtöplacentáris egység izolációjához. A jelenség régóta ismert, azonban kizárólag szövettani vizsgálatokon alapult. Az idegtudományban használatos szuperfúziós technikát alkalmazva a myometriális adrenerg transzmisszió preszinaptikus oldalának funkcionális vizsgálatára kimutattuk, hogy a szuperfúziós technika alkalmas az adrenerg rostok denervációjának vizsgálatára. A kísérletsorozat feltárta, hogy a kísérletes GDM patkányban befolyásolja a myometriális adrenerg transzmisszió preszinaptikus funkcióit, ami a noradrenalin felvevő-kapacitás és a stimulációra történő leadás szignifikáns csökkenésében nyilvánul meg. A GDM-ben kialakult és vizsgálatainkkal funkcionálisan is bizonyított korai és a fiziológiához viszonyítva fokozott denerváció diabeteses „neuropathia”-nak is felfogható. Feltételeztük, hogy a myometriális adrenerg transzmisszió preszinaptikus oldalán kimutatott funkcionális változás tükröződik a posztzinaptikus működésben vagyis az adrenerg receptorokon mediálódó motoros válaszban. Izolált szervi vizsgálatokkal feltártuk, hogy a nem terhes diabeteses uterusban markánsan eltolódott az exogén noradrenalin hatása a kontrakció irányába, ami összetevődik egyrészt az  $\alpha$ -receptorokon létrejövő összehúzóerő fokozódásából, másrészt a  $\beta$ -stimulációra adott relaxáció csökkenéséből. Az RT-PCR eredmények megadják a jelenség magyarázatát. GDM-ben a  $\alpha_{1B}$  AR-ok expressziója szignifikánsan nagyobb, ugyanakkor nyitott kérdés marad az  $\alpha_{1D}$  AR mRNS csökkenésének szerepe. A nem terhes diabeteses állatok terbutalinra adott csökkent relaxációs válasza nem jár együtt a myometriális  $\beta$ -AR-ok mRNS expressziójának csökkenésével. Ismert viszont, hogy az STZ kezelés csökkenti az izoprenalin adenilát-cikláz aktiváló hatását pl. patkány prostatában. Ennek alapján feltételezzük, hogy az uterusban is posztreceptorális szinten modulálódik (csökken) a  $\beta$ -stimuláció eredményessége. Terhességben viszont nem találtunk különbséget az STZ-vel kezelt és kontroll állatok uterusának motoraktivitásában az adrenerg agonisták farmakológiai reaktivitásában. Feltételezzük, hogy a terhesség által önmagában is fokozott  $\alpha$ - és csökkent  $\beta$ -adrenerg receptor expressziót a DM már nem képes „felülbíráni”. Más a helyzet az utóbbi években kiemelt jelentőségűnek tartott  $\beta_3$ -altípus-szelektív adrenerg receptorok esetében. Diabeteses terhes patkány uterusban  $\beta_3$ -AR-ok mRNS expressziójának szignifikáns

csökkenésével a  $\beta_3$ -szelektív agonista BRL-37344 tocolytikus hatása is szignifikánsan csökken.

GDM-ben a patkány uterus korábban reagál és érzékenyebb az exogén oxytocinra. Ez pedig a fiziológiához képest korai adrenerg denerváció mellett azt is felveti, hogy diabetesben a myometrium egy előrehaladottabb gesztációs korú szervként viselkedik. Diabetesben az oxytocin receptorok fokozott mRNS expresszióját és ezen keresztül az oxytocin hatásának fokozódását elsőként igazoltuk terhes patkány uterusban. Eredményeink klinikai relevanciáját nehéz felmérni, amennyiben a humán viszonyok között is hasonló összefüggések érvényesülnek, akkor a diabétessel szövődött terhességek fokozott koraszülési kockázatának elhárítására az oxytocin-antagonista hatóanyagcsoport tűnik legígéretesebbnek.

Korábban in vitro experimentális farmakológiai módszerekkel kimutattuk, hogy a klinikai gyakorlatban alkalmazott ( $\beta_2$ -mimetikumok, Ca-csatorna blokkolók) valamint potenciális tocolytikumok ( $\alpha_1$ -AR blokkolók) a terhes patkány cervix rezisztenciáját fokozzák.

A GDM-ban a cervix rezisztencia szignifikánsan nagyobb, mely tocolytikumokkal tovább nem fokozható. Feltételezésünk szerint a feltárt jelenség a DM-ben megnövekedett glikolizált kollagén mennyiségének növekedésével vagy a lebomlás gátlásával magyarázható. Klinikai relevanciája retrospektív esettanulmányok feldolgozásával a jövőben feltárható.